

P/ ENT COOPERATION TREA

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing:

07 December 2000 (07.12.00)

To

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2 5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.:

PCT/JP00/03506

Applicant's or agent's file reference:

A01196M

International filing date:

31 May 2000 (31.05.00)

Priority date:

31 May 1999 (31.05.99)

Applicant:

CHIBA, Masatoshi

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

31 May 2000 (31.05.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

11'

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
5th Floor, KRF Bldg.
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON

RECEIVED

01.10.1991

SIKs & Co.

mark

Date of mailing (day/month/year)
20 September 2001 (20.09.01)

Applicant's or agent's file reference
A01196M

International application No.
PCT/JP00/03506

Applicant
MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al

IMPORTANT NOTIFICATION

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,PT,SD,SE, SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Elliott PERETTI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A01196M	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)
International application No. PCT/JP00/03506	International filing date (day month year) 31 May 2000 (31.05.00)	Priority date (day month year) 31 May 1999 (31.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/22, 9.14, 47/02, 47/18, 47/36		
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00)	Date of completion of this report 27 February 2001 (27.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03506

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:* the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03506

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2,3,5,6,8-14,20,21	YES
	Claims	1,4,7,15,17-19	NO
Inventive step (IS)	Claims	5,6,20,21	YES
	Claims	1-4,7-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document: JP, 6-40938, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.)

The above document (particularly Example 2 on page 3, left column) describes a freeze-dried preparation containing 1 mg of hepatocyte growth factor (HGF), i.e., at a concentration of less than 5 mg/ml of HGF, sodium chloride, and heparin as a sulfated polysaccharide in 100 ml of a phosphate buffer. Since a sulfated polysaccharide is referred to as a stabilizer together with an amino acid in the freeze-dried preparation of the invention of the present application, it is considered that heparin in the above document also functions as a stabilizer in the freeze-dried preparation.

So, the above document describes the subject matters of claims 1, 4, 7, 15 and 17 of the present application.

Furthermore, the concentration and pH during re-dissolution, the presence or absence of a surfactant, and the surfactant used are mere matters of selection by a person skilled in the art in formulation.

So, the subject matters of claims 1-4 and 7-19 do not appear to involve an inventive step.

The subject matters of claims 5, 6, 20 and 21 of the present application, in which a specific amino acid is used as a stabilizer, appear to be novel and to involve an inventive step in view of the description of the above document.

The subject matters of claims 1-21 of the present application appear to be industrially applicable.

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

今村 正純

あて名

〒 104-0031

東京都中央区京橋1丁目5番5号
KRFビル5階 特許事務所サイクス

PCT見解書

(法第13条)

(PCT規則66)

発送日
(日.月.年)

2000.03

出願人又は代理人
の書類記号

A01196M

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JP00/03506

国際出願日

(日.月.年)

31.05.00

優先日

(日.月.年)

31.05.99

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

出願人 (氏名又は名称)

三義化学株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I 見解の基礎
 II 優先権
 III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 IV 発明の単一性の欠如
 V 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 VI ある種の引用文献
 VII 国際出願の不備
 VIII 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 30.09.01 である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信	4C 9455
	電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT1-4条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	PCT1-9条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ、図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ、図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ、図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii))に定める見解、それを裏付る文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2, 3, 5, 6, 8-14, 16	有
	請求の範囲	1, 4, 7, 15, 17-19	無
進歩性 (I S)	請求の範囲	5, 6, 20, 21	有
	請求の範囲	1-4, 7-19	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1-21	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

文献: JP, 6-40938, A (住友製薬株式会社)

上記文献の特に第3頁左欄の実施例2には、リン酸緩衝液100mlに 肝実質細胞増殖因子 (HGF) 1mg、すなわち、HGF 5mg/ml未満の濃度で含有し、塩化ナトリウム、及び硫酸化多糖類であるヘパリンを含有する凍結乾燥製剤が記載されている。本願発明の凍結乾燥製剤における安定化剤として硫酸化多糖類がアミノ酸類と共に選択肢として挙げられていることから、上記文献におけるヘパリンもまた、凍結乾燥製剤中において安定化剤として機能しているものと認められる。

したがって、上記文献には、本願の請求の範囲1、4、7、15、及び、17乃至19記載の発明が記載されている。

また、再溶解時の濃度、pHや界面活性剤の有無やその種類といったものは製剤化に際しての当該技術分野の専門家による単なる選択的事項にすぎない。

したがって、本願の請求の範囲1乃至4、及び、7乃至19記載の発明は進歩性を有さない。

特定のアミノ酸類を安定化剤とする本願の請求の範囲5、6、20及び21記載の発明については、上記文献における記載によってはその新規性及び進歩性が否定されるものではない。

本願の請求の範囲1乃至21記載の発明は、産業上の利用可能性を有する。

NOV 2001

1/4

特許

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

0-1	受理官庁記入欄 国際出願番号。	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際 出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理 官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A01196M
I	発明の名称	HGF凍結乾燥製剤
II	出願人 II-1 この欄に記載した者は II-2 右の指定国についての出願人で ある。 II-4ja II-4en II-5ja II-5en II-6 II-7 II-8 II-9 II-10	出願人である (applicant only) 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US) 名称 Name あて名: Address: 国籍 (国名) 住所 (国名) 電話番号 ファクシミリ番号 電子メール
		三菱化学株式会社 MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION 100-0005 日本国 東京都 千代田区 丸の内二丁目5番2号 5-2, Marunouchi 2-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005 Japan 日本国 JP 日本国 JP 03-3283-6977 03-3283-6984 BISICH J24901

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	千葉 雅俊
III-1-4en	Name (LAST, First)	CHIBA, Masatoshi
III-1-5ja	あて名:	314-0255 日本国 茨城県 鹿島郡波崎町 砂山 14
III-1-5en	Address:	三菱化学株式会社鹿島事業所内 c/o MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION, KASHIMA PLANT 14, Sunayama Hazaki-machi, Kashima-gun, Ibaraki 314-0255 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	今村 正純
IV-1-1en	Name (LAST, First)	IMAMURA, Masazumi
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国 東京都 中央区
IV-1-2en	Address:	京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3271-1331
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3271-1410
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾
IV-2-1en	Name(s)	SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国

特許協力条約に基づく国際出願願書

京本(出願用) - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締 約国になった国)	DZ AG MZ	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の中 の指定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされ ることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張		
VI-1-1	先の出願日	1999年05月31日 (31.05.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-151769	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	27	-
VIII-3	請求の範囲	3	-
VIII-4	要約	1	a01196m.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-7	合計	35	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-9	手数料計算用紙	✓	-
VIII-10	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当す る特許印紙を貼付した書 面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振 込みを証明する書面	-

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純
IX-2	提出者の記名押印	
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫
IX-3	提出者の記名押印	
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない。]

0	受理官庁記入欄 国際出願番号.		
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。		
0-4-1		PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)	
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A01196M	
2	出願人	三菱化学株式会社	
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,000	
12-4	30枚を越える用紙の枚数 5		
12-5	用紙1枚の手数料 (X) 1,100		
12-6	合計の手数料 b2	5,500	
12-7	b1 + b2 = B	51,500	
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数 85		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 8) 8		
12-10	1指定当たりの手数料 (X) 9,900		
12-11	合計の指定手数料 D 79,200		
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 -14,200		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	116,500
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数 1		
12-15	1 優先権証明書当たり (X) の手数料 1,500		
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,500
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P) T	⇒	213,000
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9621 弁理士 今村正純
--------	--------------------	---------------

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2000年05月31日 (31.05.2000) 水曜日 09時24分53秒

A01196M

13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9263 弁理士 塩澤寿夫
13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9584 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定からは ずされています: KP) 確認してください。
		Yellow! "追加する指定国"の欄を用いた指定がなされています が、この欄を用いることなく、更新された最新のメイ ンテナンステーブルを入手し使用することを推奨しま す。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか?
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他 のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を 用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語 版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外 の文字について、願書と電子データを注意して比較し てください。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
5th Floor, KRF Bldg.
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 07 December 2000 (07.12.00)		
Applicant's or agent's file reference A01196M		
International application No. PCT/JP00/03506	International filing date (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00)	Priority date (day/month/year) 31 May 1999 (31.05.99)
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 07 December 2000 (07.12.00) under No. WO 00/72873

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:
 IMAMURA, Masazumi
 5th Floor, KRF Bldg.
 5-5, Kyobashi 1-chome
 Chuo-ku, Tokyo 104-0031
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 07 December 2000 (07.12.00)			
Applicant's or agent's file reference A01196M		IMPORTANT INFORMATION	
International application No. PCT/JP00/03506	International filing date (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00)	Priority date (day/month/year) 31 May 1999 (31.05.99)	
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al			
<p>1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:</p> <p>AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE National :AG,AU,BG,CA,CN,CZ,DE,DZ,IL,JP,KR,MN,MZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US</p> <p>2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:</p> <p>EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG National :AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,CH,CR,CU,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH, GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,MX,PT,SD, SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW</p> <p>3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).</p> <p>Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.</p> <p>The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.</p>			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

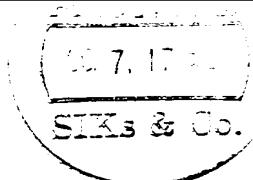
NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
 5th Floor, KRF Bldg.
 5-5, Kyobashi 1-chome
 Chuo-ku, Tokyo 104-0031
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A01196M	International application No. PCT/JP00/03506

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION (for all designated States except US)
 CHIBA, Masatoshi (for US)

International filing date : 31 May 2000 (31.05.00)
 Priority date(s) claimed : 31 May 1999 (31.05.99)
 Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 16 June 2000 (16.06.00)
 List of designated Offices :

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
 EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
 EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
 OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
 National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,
 FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,
 MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,
 YU,ZA,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Masashi HONDA Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
5th Floor, KRF Bldg.
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 September 2000 (19.09.00)	
Applicant's or agent's file reference A01196M	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/03506	International filing date (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 31 May 1999 (31.05.99)
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
31 May 1999 (31.05.99)	11/151769	JP	27 July 2000 (27.07.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Tessadel PAMPLIEGA <i>Tess</i> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

Translation

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A01196M	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No. PCT/JP00/03506	International filing date (day month year) 31 May 2000 (31.05.00)	Priority date (day month year) 31 May 1999 (31.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38.22, 9/14, 47 02, 47 18, 47 36		
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00)	Date of completion of this report 27 February 2001 (27.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03506

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application * the international application as originally filed the description:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the claims:pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the drawings:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the sequence listing part of the description:pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets fig. _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP00 03506

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2,3,5,6,8-14,20,21	YES
	Claims	1,4,7,15,17-19	NO
Inventive step (IS)	Claims	5,6,20,21	YES
	Claims	1-4,7-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document: JP, 6-40938, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.)

The above document (particularly Example 2 on page 3, left column) describes a freeze-dried preparation containing 1 mg of hepatocyte growth factor (HGF), i.e., at a concentration of less than 5 mg/ml of HGF, sodium chloride, and heparin as a sulfated polysaccharide in 100 ml of a phosphate buffer. Since a sulfated polysaccharide is referred to as a stabilizer together with an amino acid in the freeze-dried preparation of the invention of the present application, it is considered that heparin in the above document also functions as a stabilizer in the freeze-dried preparation.

So, the above document describes the subject matters of claims 1, 4, 7, 15 and 17 of the present application.

Furthermore, the concentration and pH during re-dissolution, the presence or absence of a surfactant, and the surfactant used are mere matters of selection by a person skilled in the art in formulation.

So, the subject matters of claims 1-4 and 7-19 do not appear to involve an inventive step.

The subject matters of claims 5, 6, 20 and 21 of the present application, in which a specific amino acid is used as a stabilizer, appear to be novel and to involve an inventive step in view of the description of the above document.

The subject matters of claims 1-21 of the present application appear to be industrially applicable.

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 A01196M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03506	国際出願日 (日.月.年) 31.05.00	優先日 (日.月.年) 31.05.99
出願人(氏名又は名称) 三菱化学株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
 - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
 - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし
 - 出願人は図を示さなかった。
 - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	JP, 6-40938, A (住友製薬株式会社) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) 特に、第3頁左欄 実施例2 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN. 120:200456	1-4, 7-19/ 5, 6, 20, 21
A	EP, 456188, A1 (TOYOB0 CO., LTD.) 13. 11月. 1991 (13. 11. 91) whole document, & JP, 4-18028, A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 08. 00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信



4C 9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 30 MAR 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 A01196M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03506	国際出願日 (日.月.年) 31.05.00	優先日 (日.月.年) 31.05.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36		
出願人（氏名又は名称） 三菱化学株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I 国際予備審査報告の基礎
II 優先権
III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV 発明の単一性の欠如
V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ある種の引用文献
VII 国際出願の不備
VIII 国際出願に対する意見

RECEIVED
DEC 18 2002
TECH CENTER 1600/2900

国際予備審査の請求書を受理した日 31.05.00	国際予備審査報告を作成した日 27.02.01
名称及びあて先 日本特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関 1丁目 1番 5号	特許庁審査官（権限のある職員） 森井 一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3451 4C 9455

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(c)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(5)にいう国際公開の言語
- 國際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 2, 3, 5, 6, 8-14, 16, 20, 21 請求の範囲 1, 4, 7, 15, 17-19	有 無
進歩性 (I S)	請求の範囲 5, 6, 20, 21 請求の範囲 1-4, 7-19	有 無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1-21 請求の範囲	有 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献 : JP, 6-40938, A(住友製薬株式会社)

上記文献の特に第3頁左欄の実施例2には、リン酸緩衝液100mlに、肝実質細胞増殖因子(HGF)1mg、すなわち、HGF5mg/ml未満の濃度で含有し、塩化ナトリウム、及び硫酸化多糖類であるヘパリンを含有する凍結乾燥製剤が記載されている。本願発明の凍結乾燥製剤における安定化剤として硫酸化多糖類がアミノ酸類と共に選択肢として挙げられていることから、上記文献におけるヘパリンもまた、凍結乾燥製剤中において安定化剤として機能しているものと認められる。

したがって、上記文献には、本願の請求の範囲1、4、7、15、及び、17乃至19記載の発明が記載されている。

また、再溶解時の濃度、pHや界面活性剤の有無やその種類といったものは製剤化に際しての当該技術分野の専門家による単なる選択的事項にすぎない。

したがって、本願の請求の範囲1乃至4、及び、7乃至19記載の発明は進歩性を有さない。

特定のアミノ酸類を安定化剤とする本願の請求の範囲5、6、20及び21記載の発明については、上記文献における記載によってはその新規性及び進歩性が否定されるものではない。

本願の請求の範囲1乃至21記載の発明は、産業上の利用可能性を有する。

(12)特許協力条約に基づいて公開された出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2000年12月7日 (07.12.2000)

PCT

(10)国際公開番号
WO 00/72873 A1

(51)国際特許分類: A61K 38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

(74)代理人: 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.);
〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル
5階 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号:

PCT.JP00/03506

(22)国際出願日:

2000年5月31日 (31.05.2000)

(25)国際出願の言語:

日本語

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30)優先権データ:

特願平11/151769 1999年5月31日 (31.05.1999) JP

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二
丁目5番2号 Tokyo (JP).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 千葉雅俊 (CHIBA,
Masatoshi) [JP/JP]; 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂
山14 三菱化学株式会社 鹿島事業所内 Ibaraki (JP).2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: FREEZE DRIED HGF PREPARATIONS

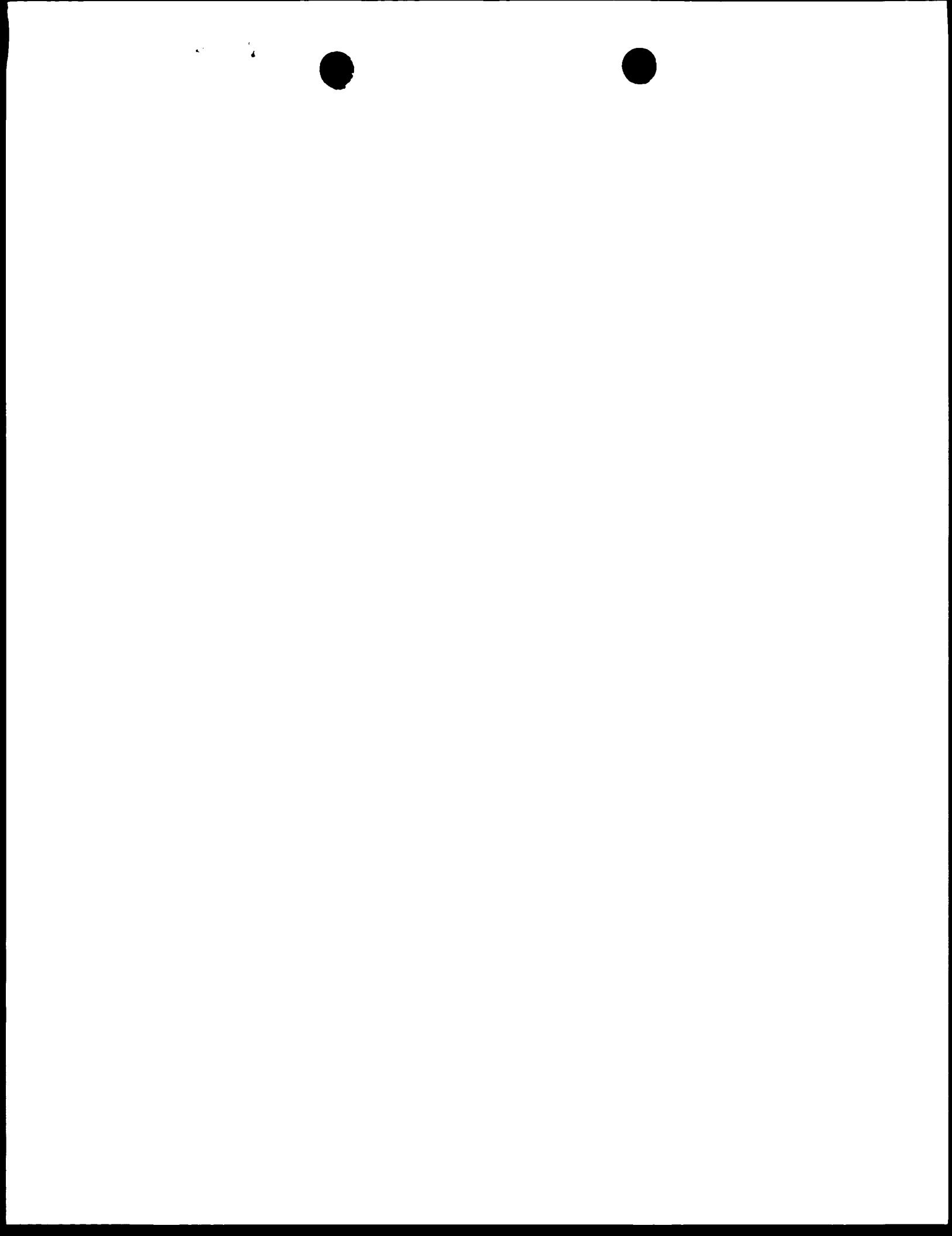
(54)発明の名称: HGF凍結乾燥製剤

(57) Abstract: Freeze dried preparations containing hepatocyte growth factor (HGF), a stabilizer such as arginine or lysine, sodium chloride and a buffer. These preparations, which are produced from an aqueous solution containing less than 5 mg/mL of HGF and/or to be used in producing an aqueous solution containing less than 5 mg/mL of HGF, are excellent in storage stability.

(57)要約:

WO 00/72873 A1

肝実質細胞増殖因子 (HGF)、アルギニン又はリジンなどの安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、及び/又は再溶解により肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための保存安定性に優れた製剤。



明細書

HGF凍結乾燥製剤

技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤に関する。

背景技術

肝実質細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: 以下、本明細書において「HGF」と略す場合がある。) は肝実質細胞の増殖活性を有するタンパク質であり、種々の動物種においてその存在が知られており、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されている。ヒト肝実質細胞増殖因子 (以下、本明細書において「hHGF」と略す場合がある。) は、大工原らにより劇症肝炎患者血漿より見出され (特開昭 63-22526 号公報)、その後、喜多村らにより hHGF タンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子 (cDNA) 配列が明らかにされた (特開平 3-72883 号公報)。さらにこの cDNA を用いた hHGF タンパク質の生産方法及び形質転換体が報告されるにいたり (特開平 3-285693 号公報)、hHGF タンパク質の大量生産が可能となり医薬品としての応用が期待されている。

hHGF は糖タンパク質の一種であり、分子量は非還元状態では約 80~90 kDa、還元状態では約 52~56 kDa の α サブユニットと約 30~36 kDa の β サブユニットからなるヘテロダイマーである。hHGF は、肝細胞増殖因子としての活性のほか、スキャター因子 (scatter factor; SF) 活性、腎臓尿細管上皮細胞増殖因子活性、損傷組織修復因子活性、血管内皮細胞増殖因子活性など多様な生物活性を有しており、肝臓疾患治療薬、腎臓疾患治療薬、脳神経障害治療剤、育毛促進剤、創傷治療薬、抗腫瘍治療薬などの医薬としての開発が期待されている。

HGF の製剤については、W090/10651 公報、特開平 6-247872 号公報、及び特開平 9-25241 号公報に記載がある。上記 W090/10651 公報には、HGF と比較して

アミノ酸5残基が欠失したデリーシヨンタイプのHGF (TCF) の水溶液製剤が開示されており、アルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等がTCFを水溶液中で安定化することが教示されている。特開平6-247872号公報には、塩基性アミノ酸等とTCFを共存させることにより、TCFを5～10 mg/mLの高濃度に含有させた注射剤が開示されている。この刊行物にはTCFの水溶液での溶解性が言及されており、TCFを高濃度に含有させた水溶液が開示されているが、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）は注射液剤の「溶解補助剤」として用いられている。

しかしながら、HGFの水溶液製剤は、中性pHにおいて溶解性が急激に低下し、低温又は室温で数日間保存すると凝集、白濁、ゲル化が進行するという問題を有している。また、類縁体・重合体が形成されるなど物理化学的安定性が低く、生物活性が低下するなど製剤安定性が低く、生物学的活性の点からも長期間の保存には適しない。さらに、HGFの水溶液製剤は、振とう攪拌による泡立ち等により凝集、白濁、ゲル化を引き起こし、長期間の保存及び流通運搬の際に製剤品質の低下、薬効の低減がもたらされる。このため、HGFの製剤としては、凍結乾燥製剤が好適である。

特開平9-25241号公報にはHGF (TCF) の凍結乾燥製剤が開示されているが、本発明とは異なり、クエン酸塩を緩衝液として用い、安定化剤としてグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール等を用いることにより、長期間にわたり安定な高濃度HGF (TCF) 凍結乾燥製剤を提供できることが教示されている。しかしながら、この凍結乾燥製剤は、緩衝液としてクエン酸を用いるために再溶解後のpHが酸性条件であり、また溶液の浸透圧が高いために、注射投与の際の痛み、投与部位での炎症反応、溶血現象を誘起するなどの問題を有している。

また、HGFは極めて生理活性の強い物質であり、医薬として使用する場合には非常に低濃度の製剤として臨床の場に提供される必要があるが、本発明者らの研究によれば、特開平9-25241号公報に記載されたグリシン又はアラニンを含む

HGF (TCF) の凍結乾燥製剤では、高濃度のHGFを含む水溶液から製造した凍結乾燥製剤は保存時に重合体の生成は少ないものの、臨床適用にあたり望まれる低濃度のHGF (一般的にはHGFが5 mg/mL未満の濃度であり、例えば2 mg/mL程度である。) を含む水溶液をグリシン又はアラニンの存在下で凍結乾燥した製剤は保存時に重合体の生成が認められた。従って、特開平9-25241号公報に記載されたグリシン又はアラニンは高濃度のHGFを凍結乾燥する場合の安定化剤としては有用であるものの、低濃度のHGFを凍結乾燥する場合の安定化剤としては不十分であり、低濃度のHGFを含む水溶液から重合体の生成しにくい、長期保存安定性に優れた凍結乾燥製剤を製造する方法の開発が求められていた。

発明の開示

本発明の課題は、低濃度のHGFを含む水溶液を調製可能なHGF凍結乾燥製剤を提供することにある。より具体的には、保存安定性に優れ、再溶解時に凝集、白濁、ゲル化などを生じないHGF凍結乾燥製剤を提供することが本発明の課題である。また、凍結乾燥時に良好なケーキ形成性を有し、再溶解性に優れた凍結乾燥製剤を提供することも本発明の課題である。さらに、注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有する上記製剤を提供することも本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HGFの濃度を5 mg/mL未満として安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤の存在下で凍結乾燥を行うと、ケーキ形成性、溶解性、長期保存安定性の良好な凍結乾燥製剤を製造することができること、及び該凍結乾燥製剤の製造時及び凍結乾燥製剤の保存時に重合体が生成せず、該凍結乾燥製剤が極めて高い安定性を有していることを見出した。また、この凍結乾燥製剤から調製された水溶液には凝集、白濁、ゲル化などが生じないこと、及びこのように希薄なHGFを含む水溶液が臨床的に十分な薬効を発揮できることも見出した。本発明は、上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明により、

肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製される製剤；

肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、再溶解により肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤；及び、

肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、かつ再溶解により肝実質細胞増殖因子を5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤

が提供される。

これらのHGF凍結乾燥製剤は凍結乾燥時及び凍結乾燥後の長期保存に際してもHGFの重合体が生成せず、優れた安定性を有している。また、凍結乾燥製剤から調製された水溶液には凝集、白濁、ゲル化などの生成がなく、かつ該水溶液を保存した場合にも重合体が生成しにくいという特徴を有している。

通常、バイアル中に凍結乾燥製剤を調製するために用いられる水溶液と、得られた凍結乾燥製剤をバイアル中で溶解して調製される水溶液には、同濃度の有効成分が含まれることが望ましい。従って、本発明の製剤は、好ましくはHGFを5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液をバイアル中又はアンプル中で凍結乾燥することにより製造できる。また、本発明の製剤は、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液が注射剤として望ましい5から6.5の範囲のpHを有することが好ましく、さらに、本発明の製剤は、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液が、注射剤として望ましい浸透圧、例えば、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比（1～2）を有することが好ましい。

本発明の好ましい態様によれば、安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、

グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤が提供される。これらの安定化剤は、好ましくは凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止するのに十分な量で上記製剤中に配合される。

また、本発明の別の好ましい態様によれば、緩衝剤がリン酸塩である上記HGF凍結乾燥製剤；さらに界面活性剤を含有する上記HGF凍結乾燥製剤；界面活性剤が非イオン性界面活性剤である上記HGF凍結乾燥製剤；非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である上記凍結乾燥製剤が提供される。

また、別の観点からは、HGFを5 mg/mL未満の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥するために用いるHGFの安定化剤であって、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤が本発明により提供される。好ましい安定化剤は、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれ、特に好ましい安定化剤はアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる。この安定化剤は、HGFを5 mg/mL未満の濃度で含有する水溶液の凍結乾燥時及び凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止することができる。

さらに、本発明により、上記安定化剤及び5 mg/mL未満の濃度のHGFを含有する水溶液を凍結乾燥して得ることができ、再溶解により5 mg/mL未満の濃度の

HGFを含有する水溶液を調製するためのHGF凍結乾燥製剤が提供される。上記の凍結乾燥製剤の好ましい製剤は、上記安定化剤（好ましくはアルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤）、5 mg/mL未満の濃度のHGF、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する水溶液をバイアル中で凍結乾燥して得ることができる。

発明の実施するための最良の形態

本発明の凍結乾燥製剤に含まれるHGFの種類は特に限定されない。例えば、HGFを含有することが知られているヒトやラット等のほ乳動物由来の体液や組織、または自発的にHGFを産生する細胞から天然のHGFを単離してもよいが、遺伝子組換え法により該増殖因子cDNAを細胞に導入して得られる組換えHGFを用いてもよい。組換えHGFを産生させる宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。具体例には、組換えHGFとして、例えば、上記ほ乳動物由来の胎盤、肝障害患者肝組織及び血液、MRC-5細胞、IMR-9細胞などの線維芽細胞株、あるいは特開平3-285693号公報に記載された方法に従いhHGFをコードするcDNAを含む発現ベクターをCHO細胞等の宿主に導入した産生株などから得られたものを挙げができる。

また、HGFとしては、シグナル配列を有する蛋白質などの前駆体蛋白質や、肝実質細胞を増殖させる活性を損なわない範囲において一部のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は挿入した修飾蛋白質や糖類を欠失又は置換した改変体を用いてもよい。改変体としては、例えば、特開平2-288899号公報、W090/10651号公報、特開平3-130091号公報、同3-255096号公報、同4-30000号公報、Nature, 342, 440-443(1989)等に記載されたものを挙げができる。

本発明の凍結乾燥製剤に好適に用いられるHGFとして、以下の理化学的性質を有する蛋白性因子を挙げることができる。またHGFはヒト由来のものであることが好ましく、特に好ましいHGFとして、特開平3-72883号公報及び特開平

4-89499 号公報に記載のアミノ酸配列で表されるものを挙げることができる。

1) SDS-PAGE (非還元条件下) による推定分子量が約 76,000 ~ 92,000 である、

2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有する、及び

3) ヘパリンに対して強い親和性を有する。

さらに、好ましい HGF は、上記の理化学的性質に加えて、

4) 80°C、10 分間の加熱処理により上記活性が失活する、及び

5) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活する、

を有する。

HGF、緩衝剤、及び塩化ナトリウムの 3 成分を含む HGF 凍結乾燥製剤 (特開平 6-247872 号公報又は特開平 9-25241 号公報に記載のもの : HGF 濃度は 5 ~ 20 mg/mL) において、HGF の沈殿などの問題を回避するために HGF の含有量を低下させると、凍結乾燥工程において良好なケーキが得られないという問題があり、さらに、上記 3 成分から得られた凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化が認められ、十分な物理化学的安定性を達成できないという問題もある。従って、凍結乾燥により良好なケーキ形状を与え、かつ長期間の保存安定性に優れた水溶液を製造できる凍結乾燥製剤を調製するためには、ケーキ形成性および水溶液における保存安定性の改善を目的とした添加剤の添加が必須である。

本発明の凍結乾燥製剤は、HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含む水溶液から調製され、及び/又は凍結乾燥製剤から製造される水溶液が HGF を 5 mg/mL 未満の濃度で含むように調製される。好ましくは、凍結乾燥前及び/又は再溶解後の水溶液が、注射剤として望ましい pH と、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比 (1 ~ 2) を有するように調製することができる。本発明の凍結乾燥製剤は、保存安定性に優れるという特徴を有している。また、凍結乾燥工程により良好な凍結乾燥ケーキを形成することができ、凍結乾燥製剤を再

溶解した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化などの問題がなく、十分な物理化学的安定性を達成できるという特徴がある。さらに、臨床適用した場合には、所望の薬理作用を十分に発揮することができる。

安定化剤としては、アルギニン；リジン；ヒスチジン；グルタミン；プロリン；グルタミン酸；アスパラギン酸；ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケタラン硫酸、デキストラン硫酸等の硫酸化多糖類；およびこれらの薬理上許容される塩を挙げることができる。薬理上許容される塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩等を挙げることができる。これら安定化剤は、二種類以上を組み合わせて用いてもよい。好ましい安定化剤としては、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等を挙げることができる。これらのうち、アルギニン、リジン、ヒスチジン、又はこれらの組み合わせが特に好ましい。安定化剤の添加量は、HGFの保存安定性を達成できる量であれば特に制限はされないが、好ましくはHGFの重量に対して0.01～100倍の重量であり、特に好ましくは0.1～30倍の重量が挙げられる。

緩衝剤としては、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液のpHを調整し、HGFの溶解性を保つ作用を有するものであれば特に限定されないが、例えば、リン酸バッファー、クエン酸バッファー、酢酸バッファーなどを用いることができる。緩衝剤として、好ましくは、リン酸バッファーを用いることができ、特に好ましくはリン酸ナトリウムバッファーを用いることができる。緩衝剤の添加量は、例えば、再溶解後の水量に対して1～100 mM程度である。

塩化ナトリウムは、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液においてHGFの溶解性を向上させるが、必要以上に添加すると浸透圧を高めるので好ましくない。一般的には、生体と等張となるような浸透圧を達成できる量を添加すればよく、特に注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比1～2が好ましく、例えば再溶解後の水量に対して140 mMとすることが好ましい。

HGFは、中性pHにおいてHGFの等電点(pI=7～8)と重なるために溶解度が急激に低下するという問題を有している。例えば、140 mM塩化ナトリウ

ムを含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (P B S ; 室温) において pH 7. 0～7. 5 付近では 1.0 mg/mL 弱の低い溶解度を示すが、 pH 5. 0 付近では 5 mg/mL 以上の溶解度を示し、 H G F の溶解度は低 pH 側で高くなる。また、 塩化ナトリウム濃度 0.14 M では H G F の溶解度は 1 mg/mL 程度であり、 0.3 M 以上とすると H G F は 5 mg/mL 以上の濃度で溶解する。従って、 H G F の溶解度を上昇させるためには、 pH を 5 以下の酸性条件とするか、あるいは塩化ナトリウム濃度を 0. 3 M 以上に上げることも考えられる。本発明の製剤においては、凍結乾燥前及び／又は再溶解後の水溶液の pH を弱酸性領域、具体的には pH 4. 0～6. 5、好ましくは pH 5. 0～6. 5 に調整することが好ましい。このような pH 領域においては、重合体生成が抑制される。

本発明の H G F 凍結乾燥製剤には、さらに界面活性剤を添加することが望ましい。 H G F は容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすく、特に低濃度においては H G F の容器への吸着は投与薬液中の薬物含量の低下につながる。界面活性剤を添加することによって、再溶解後の H G F の容器への吸着を防止することができる。界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、H C O -40、H C O -60、ブルロニック F-68、ポリエチレングリコール等の非イオン性界面活性剤を挙げることができ、これらを二種以上組み合わせて用いてもよい。界面活性剤として特に好ましくは、ポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤（ポリソルベート 80 等）を用いることができる。界面活性剤の添加量は、例えば、再溶解後の水重量に対して 0.001～2.0% の範囲である。

本発明の H G F 凍結乾燥製剤は、 H G F を含有する水溶液を通常の方法で凍結乾燥することにより製造できる。例えば、 H G F 、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を注射用蒸留水に溶解し、必要に応じて界面活性剤を添加した後、濾過滅菌してバイアル又はアンプル等の容器に分注して凍結乾燥することができる。本発明の H G F 凍結乾燥製剤は、製剤化に必要な他の添加剤、例えば、酸化防止剤、防腐剤、賦形剤、無痛化剤などを含んでいてもよい。凍結乾燥方法としては、例えば、（1）常圧下で冷却凍結する凍結過程、（2）溶質に拘束されない自由水

を減圧下で昇華乾燥する一次乾燥過程、(3)溶質固有の吸着水や結晶水を除去する2次乾燥過程の3つの単位操作による方法が挙げられるが(Pharm. Tech. Japan, 8(1), 75-87, 1992)、本発明の凍結乾燥製剤の製造方法はこの方法に限定されることはない。本発明の凍結乾燥製剤は、使用に際して、HGF濃度が5mg/mL未満となるように注射用蒸留水などの溶媒を加えて溶解すればよい。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

例1：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸緩衝液(pH6.5)にHGF 1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。なお、表中「→」は、温度を変化させることを示す。

表1

	凍結過程		一次乾燥過程		二次乾燥過程	
温度(°C)	20→	-40	-40	-40→ -20	-20	-20→ 20
時間(Hr)	1	5	3	48	2	24
圧力(mmHg)	760	760	<1	<1	<1	<1

例2：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸緩衝液(pH6.5)にHGF 5 mg/mLとなるように加温溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mL

ずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

例3：高濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM リン酸緩衝液（pH6.5）にHGF 10 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、高濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

例4：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM クエン酸緩衝液（pH5.0）にHGF 1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

例5：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5%グリシン、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM クエン酸緩衝液（pH5.0）にHGF 1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過した後にHGF水溶液を得る。本水溶液のpHを調整した後に、無菌的にバイアル瓶に2 mLずつ充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得ることができる。

例6：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5%アラニン、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mM クエン酸緩衝液（pH5.0）にHGF 1 mg/mLとなるように溶解し、無菌濾過し

た後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 7：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニンを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。この製剤は使用時に 2 mL の注射用蒸留水に溶解することにより HGF を 1 mg/mL 含有し、注射剤として許容される pH および浸透圧比 (1.5；ほぼ等張) を有する注射液とすることができます。

例 8：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができます。

例 9：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 2 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができます。

例 1 0 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 3 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 1 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 4 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 2 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に HGF 5 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 3 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 4：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH5.5) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 5：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH5.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 6：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 7：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) の代わりに 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 8：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、100 mM アルギニンの代わりに 50 mM アルギニンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 1 9：低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにリジンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 0 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにヒスチジンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 1 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグルタミンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 2 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにシステインを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 3 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにプロリンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 4 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグルタミン酸ナトリウムを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 5 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにアスパラギン酸ナトリウムを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 6 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例 8 において、アルギニンの代わりにグリシンを用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 7 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

例 8 において、バイアル瓶への充填量 2mL の代わりに 5mL を用いて、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

例 2 8 : 低濃度凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) にテキストラン硫酸ナトリウム 50 mg/mL および HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得る。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様な条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得ることができる。

試験例 1 : HGF の溶解度に関する評価

(1) HGF の溶解度の評価方法

HGF をポリプロピレン製チューブに秤量し、種々の濃度の塩化ナトリウムおよび安定化剤、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を添加後、直ちにチューブを一定温度に 24 時間保持し、HGF を溶解した。溶解後直ちに遠心分離 (15,000 rpm、10 分間、一定温度) を行い、HGF 鮎和溶液と未溶解 HGF を完全に分離し、上清をサンプリングした。低タンパク吸着性フィルター；ミリボア GV (親水性デュラボア ; 0.22 μm) で濾過し、得られた鮎和溶液中の HGF 濃度を HPLC 法 (ゲル濾過法) により定量し、HGF の鮎和溶解度を求めた。

HPLC による分析条件

カラム : TOSOH TSK G-3000SW X L (φ0.78×30cm)

流速 : 0.3 mL/min

検出波長 : OD 280nm

温度 : 30°C

キャリアー: 0.3 M NaCl, 50 mM Phosphate Na, 0.1% SDS, pH7.5

アプライ: 50 μ l

HGF の保持時間: 24.0 min

(2) HGF の溶解度におよぼす pH の影響

140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で、pH の異なる溶液を調製し、4°C および 20°C における HGF の溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 2 に示した。pH の低下に伴い、HGF の溶解度は徐々に増加し、pH 5.0 以下で顕著な溶解度の向上が確認された。また、いずれの場合も温度上昇に依存した溶解度の増加を認めた。

表 2

	20°C	4°C
pH 7.5	0.8	0.4
pH 7.0	1.8	1.0
pH 6.0	2.3	1.3
pH 5.0	5.9	4.2

(HGF の溶解度を mg/mL で示した)

(3) HGF の溶解度におよぼす塩化ナトリウム濃度の影響

種々の濃度の塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) を調製し、4°C および 20°C における HGF 溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 3 に示した。塩化ナトリウム濃度を上昇させるにしたがって、HGF の顕著な溶解度の増加を認めた。また、いずれの場合にも、温度上昇に依存した HGF の溶解度の増加を認めた。

表3

	20 °C	4 °C
無添加	0.3	0.1
+ 140 mM NaCl	0.8	0.4
+ 230 mM NaCl	3.2	1.4
+ 300 mM NaCl	8.5	4.0
+ 900 mM NaCl	> 190	—

(HGFの溶解度を mg/mL で示した)

(4) HGFの溶解度におよぼす各種安定化剤の影響

各種医薬品添加剤のHGF溶解度におよぼす影響について検討した。種々の濃度の添加剤、140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8~7.5)に、HGF 1 mg/mLとなるように溶解し、HGF水溶液を得た。96穴マイクロタイタープレートに各ウェルあたり200 μLずつ分注し、4°Cにて48時間保存した後、プレートリーダーにてOD 450 nmを測定しHGF水溶液の濁度を求めた。HGFの溶解度が低下し、HGFが凝集・沈殿するにともない溶液の濁度が上昇した。

添加物として、L-アミノ酸20種類(アルギニン、リジン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン)、糖類7種類(マンニトール、果糖、トレハロース、ブドウ糖、ソルビトール、ショ糖、乳糖)、高分子類3種類(デキストラン硫酸、デキストラン、PEG)、タンパク質類3種類(ヒト血清アルブミン、酸性ゼラチン、塩基性ゼラチン)、界面活性剤3種類(ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-40、HCO-

60) について HGF の溶解度におよぼす影響を評価したところ、下記の物質に HGF の溶解度を保持する安定化作用が認められた。

- ①アミノ酸類；アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、システイン、プロリン
(0.05 M で効果が確認された)
- ②多糖類；デキストラン硫酸 (0.1% で効果が確認された)

顕著な効果が認められたアミノ酸について、種々の濃度のアミノ酸、140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を調製し、4°C における HGF の溶解度を (1) の方法で検討し、その結果を表 4 に示した。

表 4

		飽和溶解度	浸透圧比
添加剤なし		1. 0	1. 0
+ L-A r g	5 0 mM	7. 3	1. 3
+ L-L y s	5 0 mM	4. 5	1. 3
+ L-H i s	5 0 mM	3. 2	1. 2
+ L-G l u N a	5 0 mM	2. 2	1. 3
+ L-A r g	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L-L y s	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L-H i s	1 0 0 mM	4. 8	1. 4
+ L-G l u N a	1 0 0 mM	3. 2	1. 6

(HGF の溶解度を mg/mL で示した)

試験例 2

凍結乾燥前後の H G F 水溶液の性状

凍結乾燥過程における H G F の物理的安定性の変化を確認するため、凍結乾燥前の H G F 水溶液及び凍結乾燥後そのまま精製水で再溶解した H G F 水溶液を、4°C にて 24 時間保存後、溶解後の溶液の性状（濁り）を目視により観察した。凍結乾燥製剤の再溶解にかかる時間および浸透圧比についても評価した。その結果を表 5 に示す。

実施例 1 および 2 の製剤において、凍結乾燥製剤を再溶解した後に 4°C にて 24 時間保存することにより白濁したが、その他の実施例の製剤の性状に関しては安定であった。

表 5

製剤	凍結乾燥前の水溶液	再溶解後の水溶液	浸透圧比
実施例 1	白濁	瞬時、白濁	1.0
実施例 4	澄明	瞬時、澄明	2.0
実施例 5	澄明	溶けづらい、澄明	4.0
実施例 6	澄明	溶けづらい、澄明	3.9
実施例 8	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 19	澄明	瞬時、澄明	1.6
実施例 20	澄明	瞬時、澄明	1.4
実施例 21	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 22	澄明	溶けづらい、白濁	1.7
実施例 23	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 24	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 25	澄明	瞬時、澄明	1.5
実施例 26	澄明	瞬時、澄明	1.3
実施例 28	澄明	瞬時、澄明	1.3

試験例 3

凍結乾燥製剤溶解後の性状

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後および 25°C、40°C、50°C にて 1 ケ月間保存後、再溶解にかかる時間、再溶解後の溶液の性状（濁り）を評価した。凍結乾燥製剤の溶解は精製水で行い、室温にて性状を評価した。その結果を表 6 に示す。

25°C 保存において、実施例 22 の製剤において、凍結乾燥製剤を再溶解直後に白濁したが、その他のいずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。また、40°C および 50°C の保存においては、実施例 1, 22, 23, 24 および 25 の製

剤は溶解直後に白濁したが、その他のいずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。

表 6

製剤	1ヶ月保存品		
	25°C	40°C	50°C
実施例 1	瞬時、澄明	瞬時、白濁	瞬時、白濁
実施例 4	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 5	溶けづらい、澄明	溶けづらい、澄明	溶けづらい、澄明
実施例 6	溶けづらい、澄明	溶けづらい、澄明	溶けづらい、澄明
実施例 8	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 19	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 20	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 21	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 22	溶けづらい、白濁	溶けづらい、白濁	溶けづらい、白濁
実施例 23	瞬時、澄明	瞬時、白濁	瞬時、白濁
実施例 24	瞬時、澄明	瞬時、白濁	瞬時、白濁
実施例 25	瞬時、澄明	瞬時、白濁	瞬時、白濁
実施例 26	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明
実施例 28	瞬時、澄明	瞬時、澄明	瞬時、澄明

試験例 4

凍結乾燥製剤における重合体含量変化

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後（イニシャル）、および 25°C、40°C、50°C にて 1 ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量と HG F 含量の比を測定した。試験例 1 (1) の方法（ゲル濾過法）を使用した。その

結果を表7および表8に示す。

重合体の保持時間：20.4 min, 21.8 min

H G Fの保持時間：24.0 min

保存温度の上昇にともない重合体生成に増加傾向が観察されるものの、特に実施例8, 19および20の凍結乾燥製剤は重合体の生成は極端に少なく物理化学的に安定であった。アルギニン、リジンおよびヒスチジンを添加することにより、高温保存しても重合体の生成は少なく（重合体生成率：40°Cにおいて約3%以下、50°Cにおいて約5～9%以下）、保存安定性が向上することが判明した。また、比較例として、アルギニンを含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例1の凍結乾燥製剤を用いて同様な試験を実施したが、保存温度の上昇に伴い重合体生成の大幅な増加が観察された。

また表8に示されるように、H G F濃度を低濃度化（5 mg/mL未満）することにより、重合体生成は促進され、保存安定性が低下することが示された。凍結乾燥製剤の安定化剤として特開平9-25411号公報に記載されたグリシンおよびアラニンを用いた場合には、高濃度H G F凍結乾燥製剤（特開平9-25411号公報の実施例5および6:20 mg/mL）に比べ、低濃度H G F凍結乾燥製剤（実施例5, 6および26:1 mg/mL）では重合体生成が促進され、保存安定性が低下することが判明した。

一方、凍結乾燥製剤の安定化剤としてアルギニン、リジンおよびヒスチジンを用いた実施例8, 19および20の凍結乾燥製剤は、低濃度H G F凍結乾燥製剤（1 mg/mL）でも重合体の生成が顕著に抑制され、保存安定性が向上することが示された。

表 7

製剤	イニシャル	1ヶ月保存品		
		25°C	40°C	50°C
実施例 1	0.48	5.50	24.27	40.63
実施例 4	0.35	0.48	3.80	11.24
実施例 5	0.31	0.69	4.40	9.58
実施例 6	0.30	0.54	3.20	9.53
実施例 8	0.30	0.11	0.18	0.60
実施例 19	0.31	0.16	1.74	4.48
実施例 20	0.31	0.18	0.28	0.88
実施例 21	0.31	0.54	2.77	16.89
実施例 22	—	—	—	—
実施例 23	0.32	0.31	3.24	11.24
実施例 24	0.32	2.19	4.90	6.39
実施例 25	0.34	1.11	4.80	7.73
実施例 26	0.36	0.33	6.21	22.66
実施例 28	2.74	3.48	13.30	32.87
実施例 1 *	1.07			6.17
実施例 5 *	0.92			4.09
実施例 6 *	0.93			2.90
実施例 9 *	1.78			14.01

* 特開平 9-25241 号公報の表 4 及び表 6 からの引用

表 8

製剤 50°Cで1ヶ月保存の凍結乾燥製剤
の重合体含量/HGF含量

[アミノ酸を含有しない製剤]

実施例 1 (HGF 1 mg/mL)	40.63
実施例 4 (HGF 1 mg/mL)	11.24
実施例 9* (HGF 10 mg/mL)	14.01
実施例 1* (HGF 20 mg/mL)	6.17

[グリシンを含有する製剤]

実施例 5 (HGF 1 mg/mL)	9.58
実施例 5* (HGF 20 mg/mL)	4.09

[アラニンを含有する製剤]

実施例 6 (HGF 1 mg/mL)	9.53
実施例 6* (HGF 20 mg/mL)	2.90

* 特開平9-25241号公報の表4及び表6からの引用

試験例 5

凍結乾燥製剤における重合体含量変化 - pHの重合体生成に与える影響

実施例 8, 13, 14, 16 及び 17 で調製した各種pHを有する凍結乾燥製剤を、凍結乾燥直後（イニシャル）および50°Cにて1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間保存した後に、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。試験例1(1)の方法（ゲル濾過法）を使用した。その結果を表9に示す。

重合体の保持時間；20.4 min, 21.8 min

HGFの保持時間；24.0 min

pH7.0 および 7.2 を有する実施例 1 6 および 1 7 の凍結乾燥製剤は、50°Cの保存において経時的に重合体生成が増大するものの、pH6.5 以下の pH を有する実施例 8, 1 3 および 1 4 の製剤では重合体の生成は少なく、弱酸性の pH において安定性が向上することが判明した。

表 9

製剤	イニシャル	50°C 保存品		
		1ヶ月保存	2ヶ月保存	3ヶ月保存
実施例 1 4 (pH5.5)	0.48	0.38	0.56	0.76
実施例 1 3 (pH6.0)	0.35	0.91	0.51	1.31
実施例 8 (pH6.5)	0.31	1.40	1.58	1.28
実施例 1 7 (pH7.0)	0.30	1.26	2.16	2.96
実施例 1 6 (pH7.2)	0.30	5.64	7.63	12.71

試験例 6

凍結乾燥製剤の生物活性変化（比活性）

実施例 1, 8 で作製した凍結乾燥製剤を、25°C、50°C にて 2 ヶ月間保存、あるいは 10°C、25°C にて 1.5 年間保存し、その凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液の生物活性を、下記に示す生物活性測定方法で測定した。その結果を表 1 0 に示す。

生物活性測定方法

ヒト肝細胞株 PLC/PRF/5 を対数増殖期まで培養し、細胞生存率を確認後、 0.7×10^5 個/mL となるように細胞溶液を調製する。HGF サンプル及び標準品を添加した 96 穴アッセイプレートに細胞溶液を $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、細胞数が 0.7×10^4 /ウェルとなるように播種した (n=4)。5%炭酸ガスインキュベータ内、37°C で 20 時間プレインキュベーション後、さらに、「 ^3H -チミジン」を添加し、6 時

間培養を続けた。培養完了後、ファルマシア社ベータプレートシステムを使用して、細胞の回収し、細胞内に取り込まれた「³H」量を測定した。測定結果を平行線検定法にかけ、HGFサンプルの比活性を標準品の比活性で除し、力価(%)を求めた。

実施例8のアルギニンを添加した凍結乾燥製剤においては、高温保存しても生物活性に殆ど変化はなく、生物活性の面で安定であった。また、比較例として、アルギニンを含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例1の凍結乾燥製剤を用いて同様な試験を実施したが、保存温度の上昇に伴い生物活性の大幅な低下が観察された。

表10

	2ヶ月保存品		1.5年保存品	
	25°C	50°C	10°C	25°C
実施例1	64.5%	10.2%	—	—
実施例8	87.1%	71.0%	72.6%	66.1%

産業上の利用可能性

本発明の凍結乾燥製剤は、臨床上有用な低濃度のHGFを含む水溶液を調製可能であり、凍結乾燥時及び凍結乾燥後の保存時に重合体の生成が少なく、安定性に優れている。また、凍結乾燥時に良好なケーキ形成性を有し、再溶解性に優れるという特徴を有しており、注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有する製剤として調製することも可能である。

請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製される製剤。
2. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤。
3. 肝実質細胞増殖因子、肝実質細胞増殖因子の重合体生成を防止するための安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液から調製され、かつ再溶解により肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL 未満の濃度で含有する水溶液を調製するための製剤。
4. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
5. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
6. 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
7. 緩衝剤がリン酸塩である請求の範囲第 1 項から第 6 項のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。
8. 凍結乾燥前の水溶液が注射剤として望ましい pH および浸透圧比を有する請

求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載の凍結乾燥製剤。

9. 再溶解後の水溶液が注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有する請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載の凍結乾燥製剤。

10. 凍結乾燥前の水溶液のpHが5～6.5の範囲である請求の範囲第8項又は第9項に記載の凍結乾燥製剤。

11. 再溶解後の水溶液のpHが5～6.5の範囲である請求の範囲第8項又は第9項に記載の凍結乾燥製剤。

12. さらに界面活性剤を含有する請求の範囲第1項から第11項のいずれか1項に記載の凍結乾燥製剤。

13. 界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求の範囲第12項に記載の凍結乾燥製剤。

14. 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である請求の範囲第13項に記載の凍結乾燥製剤。

15. バイアル又はアンプル中に調製された請求の範囲第1項から第14項のいずれか1項に記載の凍結乾燥製剤。

16. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止するために十分な量の安定化剤を含む請求の範囲第1項から第15項のいずれか1項に記載の凍結乾燥製剤。

17. HGFを5mg/mL未満の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥するために用いるHGFの安定化剤であって、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤。

18. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止することができる請求の範囲第17項に記載の安定化剤。

19. 凍結乾燥時及び／又は凍結乾燥後の保存時におけるHGFの重合体生成を防止するために十分な量で用いられる請求の範囲第17項に記載の安定化剤。

20. アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及び

これらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第17項から第19項のいずれか1項に記載の安定化剤。

21. アルギニン、リジン、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求の範囲第17項から第19項のいずれか1項に記載の安定化剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A61K38/22, 9, 14, 47/02, 47/18, 47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 6-40938, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 15 February, 1994 (15.02.94), especially, page 3, left column, example 2 (Family: none) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA, DN.120:200456	1-4, 7-19 5, 6, 20, 21
A	EP, 456188, A1 (TOYOCBO CO., LTD.), 13 November, 1991 (13.11.91), the whole document, & JP, 4-18028, A	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 August, 2000 (25.08.00)Date of mailing of the international search report
12 September, 2000 (12.09.00)Name and mailing address of the ISA
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K38/22, 9/14, 47/02, 47/18, 47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	JP, 6-40938, A(住友製薬株式会社) 15. 2月. 1994(15. 02. 94) 特に、第3頁左欄 実施例2 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), Columbus, OH, USA), DN. 120:200456	1-4, 7-19/ 5, 6, 20, 21
A	EP, 456188, A1(TOYOB0 CO., LTD.) 13. 11月. 1991(13. 11. 91) whole document, & JP, 4-18028, A	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であつて出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であつて、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であつて、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 08. 00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451